

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

28.08.03

#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 8月30日  
Date of Application:

出願番号 特願2002-253036  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP2002-253036]

出願人 財団法人化学及血清療法研究所  
Applicant(s):

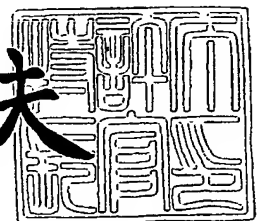
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 17 OCT 2003  
WIPO PCT

2003年10月 1日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 JP420

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09  
A61K 39/395  
C12P 21/08

【発明者】

【住所又は居所】 鹿児島県鹿児島市皇徳寺台 5 - 2 0 - 5

【氏名】 杉村 和久

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県芦屋市緑町 3 - 8 - 4

【氏名】 吉崎 和幸

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人 化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 中島 敏博

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1 3 1 4 - 1 財団法人 化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 佐々木 巧

【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト抗ヒトインターロイキン-6抗体及び該抗体フラグメント

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトインターロイキン-6（以下、IL-6）に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体または該抗体フラグメント。

【請求項2】 少なくとも $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$ 以下の解離常数を有する請求項1記載のヒト抗ヒトIL-6抗体または該抗体フラグメント。

【請求項3】 ヒトIL-6に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体のVH鎖をコードする遺伝子断片。

【請求項4】 当該VH鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項3に記載の遺伝子断片。

CDR1 : Lys Tyr Tyr Met Ala <配列番号3>

CDR2 : Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly <配列番号4>

CDR3 : Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val <配列番号5>

【請求項5】 当該抗体VH鎖が配列表配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる請求項3または4に記載の遺伝子断片。

【請求項6】 当該抗体VH鎖のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる請求項4または5のいずれかに記載の遺伝子断片。

【請求項7】 ヒトIL-6に結合し、その生物活性を阻害するヒト抗ヒトIL-6抗体のVL鎖をコードする遺伝子断片。

【請求項8】 当該VL鎖の相補性決定領域（CDR1～3）が下記のアミノ酸配列を有する請求項7に記載の遺伝子断片。

CDR1 : Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala <配列番号6>

CDR2 : Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号7>

CDR3 : Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe <配列番号8>

【請求項9】 当該抗体VL鎖が配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を

コードする塩基配列からなる請求項 7 または 8 に記載の遺伝子断片。

【請求項 10】 当該抗体 V L 鎖のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる請求項 8 または 9 のいずれかに記載の遺伝子断片。

【請求項 11】 請求項 3 から 6 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 7 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を結合してなる一本鎖 F v (以下、s c F v) 遺伝子断片。

【請求項 12】 請求項 3 から 6 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 7 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子と結合してなるヒト抗 I L - 6 抗体をコードする遺伝子断片。

【請求項 13】 請求項 3 から 6 のいずれかに記載の V H 鎖をコードする遺伝子及び請求項 6 から 10 のいずれかに記載の V L 鎖をコードする遺伝子を、それぞれヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部及びヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなるヒト抗 I L - 6 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

【請求項 14】 当該抗体フラグメントが、F a b、F a b'、または F (a b')<sub>2</sub> から選ばれる請求項 13 に記載の遺伝子断片。

【請求項 15】 請求項 11 に記載の s c F v 遺伝子を、ヒト抗体 C H 鎖遺伝子の一部、またはヒト抗体 C L 鎖遺伝子の一部と結合してなるヒト抗 I L - 6 抗体フラグメントをコードする遺伝子断片。

【請求項 16】 請求項 3 から 15 のいずれかに記載の遺伝子断片を発現ベクターに組み込み、遺伝子組換え法により発現されるヒト抗ヒト I L - 6 抗体またはヒト抗ヒト I L - 6 抗体フラグメント。

【請求項 17】 少なくとも  $1.0 \times 10^{-8} \text{M}$  以下の解離常数を有する請求項 16 に記載のヒト抗ヒト I L - 6 抗体または該抗体フラグメント。

【請求項 18】 請求項 1 から 17 に記載のヒト抗ヒト I L - 6 抗体またはヒト抗ヒト I L - 6 抗体フラグメントを有効成分として含有する I L - 6 及び I L - 6 受容体の結合活性阻害剤。

【請求項 19】 請求項 18 に記載の結合活性阻害剤を用いるヒト I L - 6

及びヒト I L - 6 受容体の結合により惹起される炎症及び免疫異常性疾患の予防または治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

ヒトインターロイキン-6（以下、I L - 6）に結合し、I L - 6 とその受容体との結合を阻害するヒト抗ヒト I L - 6 抗体及び該抗体フラグメントに関する。当該抗体及び抗体フラグメントは、I L - 6 が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

【0002】

【従来の技術】

I L - 6 は T 細胞、マクロファージ、繊維芽細胞、筋肉細胞などから、マイトジェン刺激、ウイルス感染、I L - 1 などの刺激により産生される分子量 21,000 の糖タンパク質である。ヒトでは 184 アミノ酸からなり、第 7 染色体上に遺伝子が存在する。その生物活性は多様で、1) 増殖誘導（ハイブリドーマ、T 細胞、角質細胞、腎メサンジウム細胞）、2) 増殖抑制（骨髄性白血病細胞株、悪性黒色種細胞株、3) 分化誘導及び細胞の特異的タンパク質の産生誘導（褐色細胞趣株の神経分化、キラー T 細胞分化、巨核球成熟、骨髄性白血病細胞株のマクロファージ分化、B 細胞の抗体産生、肝細胞の急性期タンパク質産生）などの機能を有する。このような多様な生物活性により、疾患との関連性も指摘されていたが、近年慢性関節リウマチ、心房内粘液腫、キャッスルマン氏病、A I D S などでの高  $\gamma$  グロブリン血症や自己免疫症状、2) メサンジウム増殖性腎炎、3) 乾癬、4) A I D S カポジ肉腫などの発症に関与することが知られている。また最近では、運動直後に骨格筋から多量の I L - 6 が産生されその視床下部を刺激して色々な神経ホルモンの分泌を促し、免疫系に影響を与えることが知られている（免疫学辞典 第 1 版 49 頁、1993）。

【0003】

一方、I L - 6 が関与する疾患の中で慢性関節リウマチ（Rheumatoid arthritis; R A）は日本全国で約 70 万人が罹患し、近年漸増の傾向にあり、患者の高齢

化も進み社会問題となりつつある (Ogata A. et al., 臨床病理 1999 Apr;47(4):321-326 [Advances in interleukin-6 therapy.] )。

#### 【0004】

原因は不明であるが、関節腔内で起こった自己免疫反応が持続し慢性化した自己免疫疾患であり、難治性特定疾患に指定されている。これまで I L - 6 との関連性について調べられ、患者の関節液中に多量に存在し、炎症惹起だけでなく、滑膜繊維芽細胞の増殖にも関わっていることが明らかにされている。また自己抗体の産生を促している可能性も考えられる (Nishimoto N. et al., Clinical application of interleukin-6 receptor antibody., 日本免疫学会誌 1997;20: 87-94)。

#### 【0005】

したがって、I L - 6 の生物活性を阻害するような抗 I L - 6 抗体を作れば、R A を含めた幾つかの免疫異常性疾患の対症療法的治療薬になる可能性があり、実際に検討が進められている (Mihara M. et al., Br J Rheumatol 1995 Apr;34(4):321-325、Mihara M. et al., Clin Immunol 2001;98:319-326)。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

R A では患者の症状の進行状況に応じて、非ステロイド系消炎鎮痛剤、ステロイド剤、免疫抑制剤、代謝阻害剤等の薬剤療法や人工関節などの外科的療法など多種多様な治療法が疾患のステージに応じて施される。しかしながらこれらはいずれも R A を根治するような治療法ではなく、長期使用や大量使用による副作用の問題も存在している。I L - 6 は炎症拡大という役割を果たしているため、患者が感じる苦痛の大きな原因となっており、I L - 6 の活性を阻害することにより苦痛が軽減出来る可能性が指摘されていた。そのための候補としてヒト型化抗 I L - 6 抗体が検討の対象として使われてきた (Montero-Julian F.A. et al., Blood 1995 Feb 15;85(4):917-24 ; Monier S. et al., Clin Exp Rheumatol 1994 Nov-Dec;12(6):595-602 ; Wendling D. et al., J Rheumatol 1993 Feb;20(2):259-62) 。一方で、I L - 6 はミエローマ細胞の増殖因子としての活性を有しており (前述: 免疫学辞典 第1版 49頁、1993) 、このため I L - 6 と高親和力

で結合する抗体を産生するハイブリドーマが得られても、産生された抗体によって培地中の I L - 6 が中和されてしまい増殖できなくなるので、結果的に高親和性の抗 I L - 6 抗体は得られにくいという問題もあった。佐藤らが報告しているマウス由来抗ヒト I L - 6 抗体は 11nM の高親和性を示したが、解離速度が  $3 \times 10^{-2}$  sec と速いものしか得られていない (Sato K. et al., Hum Antibodies Hybrids 1996;7(4):175-83)。この様な従来の方法で得られた解離速度の速い抗体を用いて I L - 6 の活性を阻害するためには高濃度を維持する必要があった。ましてや完全ヒト抗体でそのような活性を持つ抗体は知られていない。

#### 【0007】

またヒト型化抗体では、完全ヒト抗体と異なり、投与された患者では抗 I L - 6 抗体の活性を阻害するような抗体 (阻止抗体) が作り出される可能性も否定できなかった。

#### 【0008】

##### 【課題を解決するための手段】

そこで、本発明では、ファージ抗体法を用いて、スクリーニング系を工夫することにより完全ヒト抗ヒト I L - 6 一本鎖 F v (s c F v) 分子を取得し、その抗体の V H 鎖及び V L 鎖を明らかにした。さらに、その性状を解析し、当該 s c F v が、ヒト I L - 6 に対して従来得られていた抗体よりも特に解離速度が遅く ( $10^{-3}$  sec オーダー、従来より約 40 倍解離速度が遅い)、かつ高い親和性を有すること、また I L - 6 依存性細胞株の増殖を濃度依存的に抑制することを明らかにした。

#### 【0009】

この様な完全にヒト由来でかつ高親和性の抗体を用いることにより、低い抗体濃度で従来と同様の治療効果を発揮でき、従ってこの抗体に対する抗イディオタイプ抗体の産生も極めて低く抑えることが可能になり、優れた治療効果を有する抗ヒト I L - 6 抗体薬を提供することができると期待される。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

健常者 20 名分の末梢血 B リンパ球より、R T - P C R 法にて、免疫グロブリン



ン重 (H) 鎖、軽 (L) 鎖 cDNA を増幅、更に両者を linker DNA で結合し、健常者リンパ球由来の V H 鎖と V L 鎖のランダムな組み合わせによる一本鎖 F v (s c F v) DNA を作製した。

#### 【0011】

この scFv DNA をファージミドベクター pCANTAB5E に組み込み、 $10^9$  クローンからなる健常者由来 s c F v ディスプレイファージライブラリーを作製した。このライブラリーを、固相に固定化されたヒト I L - 6 と結合させて回収、濃縮し、抗ヒト I L - 6 F v ディスプレイファージクローンをスクリーニングした。その結果、スクリーニングされた s c F v クローン (IL6gk3-2) は、ヒト I L - 6 と結合する s c F v 抗体を産生した。

#### 【0012】

クローン IL6gk3-2 が産生する s c F v 抗体は、一本鎖にも関わらず通常の完全型抗体と同等の親和力でリガンド (I L - 6) に特異的に結合した。

#### 【0013】

クローン IL6gk3-2 が産生する s c F v 抗体は、ヒト I L - 6 に依存して増殖する細胞株 K T - 3 に加えたときに I L - 6 依存的増殖応答を濃度依存的に阻害した。

#### 【0014】

上記阻害活性を有する s c F v クローンの V H 鎖及び V L 鎖のアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は、下記の通りである。

##### [V H 鎖] (配列番号 1)

CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTC AAG CCC GGA GGG	48
Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly	
5 10 15	
TCC CTA AGA CTC TCA TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGA AAG TAT	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr	
20 25 30	
TAC ATG GCC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CCG GAG TGG CTT	144
Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu	

35	40	45	
TCA ACC ATT AGT AAC AGC GGT GAT ATC ATA GAC TAT GCA GAC TCT GTG			192
Ser Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
AGG GGC CGG TTC TCC ATC TCC AGG GAC AAT GCC CAG AAG TCA CTG TAT			240
Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
CTG CAA ATG ACC TCC CTG AGA CCC GAC GAC TCG GCC ATC TAT TAC TGT			288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
GCG AGG GAA TAT TTC TTT TCT TTT GAT GTG TGG GGC CGA GGG ACA ATG			336
Ala Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met			
100	105	110	
GTC ACC GTC TCC TCA			351
Val Thr Val Ser Ser			

115

【0 0 1 5】

[VL鎖] (配列番号2)

GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCT GTG TCT GCA TCG GTG GGA			48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly			
5	10	15	
GAC AGA GTC ACC ATC TTT TGT CGG GCG AGT CAG GAT ATT AGG AAT TGG			96
Asp Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp			
20	25	30	
GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGT GAG GCC CCT AAA TTA TTG ATC			144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
TAT GAT GGA TCG AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC			192
Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			

50	55	60	
AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA ATC AGC AGC CTG CAG CCT	240		
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT GAC AGT ACC CCT ATT	288		
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile			
85	90	95	
ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CGT	324		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		

## 【0016】

さらに、上記配列中、VH鎖及びL鎖のCDR1～3のアミノ酸配列を下記に示す。

## [VH鎖]

CDR1 : Lys Tyr Tyr Met Ala <配列番号3>

CDR2 : Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly <配列番号4>

CDR3 : Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val <配列番号5>

## [VL鎖]

CDR1 : Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala <配列番号6>

CDR2 : Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser <配列番号7>

CDR3 : Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe <配列番号8>

## 【0017】

上記VH鎖及びVL鎖のいずれかまたは両方の可変領域を有する抗体フラグメントは、ヒト由来抗ヒトIL-6抗体の可変領域を有し、ヒトIL-6と強く反応して、IL-6とIL-6受容体間の結合に阻害作用を示す。

## 【0018】

本発明で開示されるVH鎖及び／またはVL鎖は、ファージ抗体法を用いてscFvの形で得られたものであるが、原則としてその適用はscFvに限定され

ることはなく、開示したVH鎖及び／またはVL鎖をヒト免疫グロブリンの定常部と連結した完全分子型、またヒト免疫グロブリンの定常部の一部と組み合わせたFab、Fab'またはF(ab')<sub>2</sub>、さらにscFvをヒト免疫グロブリンの定常部と結合させた一本鎖抗体(scAb)などの他の抗体フラグメントもその適用範囲に含まれる。また、これらの抗体及び抗体フラグメント蛋白分子に高分子修飾剤を結合させた修飾蛋白分子も同様である。

#### 【0019】

以上より、本発明のヒトモノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子は、IL-6とIL-6受容体との結合によって引き起こされる種々の免疫応答を阻害することができ、消炎鎮痛剤としてあるいは自己免疫疾患の治療及び予防のための薬剤として使用することができる。

#### 【0020】

さらに、本発明のヒトモノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子はその特性から、ヒト末梢血中または筋肉内のIL-6発現細胞を検出或いは測定する免疫学的測定法を提供する事が可能である。

#### 【0021】

また、本発明のヒトモノクローナル抗体及び抗体フラグメント分子を免疫学的に不活性な吸着物質からなる免疫吸着物質と吸着させた複合体は多くの応用が可能になる。

#### 【0022】

まず第一には、ヒト末梢血中のIL-6をイムノアフィニティクロマトグラフィにより精製することができる。

さらに、遺伝子組換え法により形質転換された培養細胞から産生される培養上清中のIL-6の精製に用いることが可能である。

#### 【0023】

また、本発明のヒトモノクローナル抗体の可変部位のペプチドまたはその誘導体は、それを認識するペプチドまたは抗イデオタイプ抗体を、ライブラリーより単離する新たな手段を提供する。得られるペプチドと抗イデオタイプ抗体、及びその誘導体は、IL-6の中和による急性炎症や自己免疫疾患の治療、有効で

あることが期待できる (Vreugdenhil G. et al., Rheumatol Int 1990;10(3):127-30; Hirano T. et al., Ric Clin Lab 1989 Jan-Mar;19(1):1-10)。

#### 【0024】

以下、実施例にそって本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【0025】

##### 【実施例】

##### 《実施例1：健常者からのファージライブラリの構築》

ファージライブラリの構築は、J. D. Marks ら (J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991) により報告されている方法を参考に調製した。

健常者20名由来末梢血よりFicolを用いた比重遠心法にてリンパ球を分離し、PBSで十分に洗浄後、ISOGEN (日本ジーン) で処理して、total RNAを調製した。このtotal RNAを4つに分割し、ヒトIgG、IgM、 $\kappa$ 鎖、 $\lambda$ 鎖の定常領域に特異的なプライマーを使用し、first strand cDNA synthesis kit (Pharmacia biotech) にて、それぞれのcDNAを作製した。このcDNAをテンプレートにして、Marksらが報告したのと同様にVH ( $\gamma$  または  $\mu$ ) とJH及びV $\kappa$  とJ $\kappa$ 、V $\lambda$  とJ $\lambda$ の組合せで各ジーンファミリーに特異的なプライマーを用いて、それぞれの抗体V領域遺伝子をポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法にて増幅した。

#### 【0026】

更に、VH ( $\gamma$  または  $\mu$ ) とV $\kappa$ 、及びVH ( $\gamma$  または  $\mu$ ) とV $\lambda$ をリンカーDNAを用いて、アッセンブリーPCR法 (McCafferty, J. et al.: Antibody Engineering-a Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1996.) により結合させ、一本鎖scFv DNAを作製した。scFv DNAは更にPCRを用いて、NotI及びSfiI制限酵素部位を付加し、アガロースゲルで電気泳動後、精製した。精製したscFv DNAは制限酵素SfiI (Takara) とNotI (Takara) で消化後、ファージミドpCANTAB5E (Pharmacia) にクローニングした。scFv DNAを結合させたpCANTAB5EはVH ( $\gamma$ ) - V $\kappa$ 、VH ( $\gamma$ ) - V $\lambda$ 、VH ( $\mu$ ) - V $\kappa$ 、VH ( $\mu$ ) - V $\lambda$  毎にエレクトロポレーションにより大腸菌TG1に導入した。形質転換したTG1の数から、

$VH(\gamma)-V\kappa$ 、 $VH(\gamma)-V\lambda$ 、 $VH(\mu)-V\kappa$ 、 $VH(\mu)-V\lambda$ はそれぞれ  $1.1 \times 10^8$ 、 $2.1 \times 10^8$ 、 $8.4 \times 10^7$ 、 $5.3 \times 10^7$  クローンの多様性を有すると評価された。この形質転換したTG1から、M13K07ヘルパーファージを用いてファージ抗体を発現し、健常人由来 s c F v 提示ファージライブラリーを調製した。

#### 【0027】

##### 《実施例2：パンニング》

ヒト IL-6 は 0.1M  $\text{NaHCO}_3$  1 mL に溶解し、35mm のディッシュ（岩城）に 4℃ で一晩反応させて固定化した。0.5%ゼラチン/PBS を用いて 20℃ で 2 時間ブロッキングした後、0.1%Tween20-PBS で 6 回洗浄した。これに健常人由来の抗体ファージライブラリー（一本鎖抗体提示ファージ液）を 0.9mL ( $1 \times 10^{12}$  tu/mL) 加え、反応させた。

#### 【0028】

0.1%Tween20-PBS で 10 回洗浄した後、1.0mL のグリシン緩衝液 (pH2.2) を加え、IL-6 と結合する一本鎖抗体提示ファージを溶出させた。溶出したファージは 1M Tris (hydroxymethyl)aminomethane-HCl, pH9.1 を加えて pH を調製した後、対数増殖期の大腸菌 TG1 に感染させた。感染後の TG1 は  $3000 \times g$ , 10 分で遠心分離して、上清を除き、200  $\mu$ L の 2  $\times$  YT 培地で懸濁し、SOBAG プレート（2%グルコース、100  $\mu$ g/ml のアンピシリン含有 SOB プレート）に播き、30℃ のふ卵器中で一晩培養した。生じたコロニーは適量の 2  $\times$  Y T 培地を加えスクレイパー (Coastor) を使って懸濁、回収した。

#### 【0029】

この TG1 液 50  $\mu$ L を、30mL の 2  $\times$  Y T A G 培地に植え、ヘルパーファージを用いてレスキューし、スクリーニング後のファージライブラリーを調製した。

健常人由来ファージライブラリー  $VH(\gamma)-V\kappa$ 、 $VH(\gamma)-V\lambda$ 、 $VH(\mu)-V\kappa$ 、 $VH(\mu)-V\lambda$ 、それぞれについて前述の IL-6 固定化プレートを用いてパンニングを計 4 回行った。4 回目のパンニング後に、SOBAG プレートから任意に clone を抽出し、s c F v の発現の確認及び IL-6 ELISA による特異性の確認と塩基配列の解析を行った。

#### 【0030】

### 《実施例 3 : スクリーニング I L - 6 ELISA》

分離したクローンのスクリーニングのためのELISAは以下のように行った。ヒト I L - 6 及びコントロール蛋白をELISAプレートに固定化してスクリーニングに用いた。1.25  $\mu$ g/mLのヒト I L - 6、2.5  $\mu$ g/mLのヒト血清アルブミン (H S A)、1.25  $\mu$ g/mLのヒトMCP-1、ヒトMIP-1  $\alpha$  またはヒト A B 型血清を40  $\mu$ L/well ELISAプレート (Nunc) に入れ、4  $^{\circ}$ Cで16時間静置し、固定化した。固定化プレートは、0.5%BSA、0.5%ゼラチン及び5 %スキムミルクを含むPBS溶液400  $\mu$ L/wellをELISAプレートに入れ、4  $^{\circ}$ Cで2時間静置し、ブロッキングを行った。

#### 【0031】

s c F v 提示ファージを含む試料液を40  $\mu$ L/wellを入れて反応させた後、試料液を捨て洗浄液で5回洗った。ビオチン標識した抗M13モノクローナル抗体 (Pharmacia biotech) と反応させ、アルカリフォスファターゼ (A P) 標識した抗マウスIgG抗体と反応させた。洗浄液で5回洗った後、発色基質液 (1g/mL p-nitrophenyl phosphate (Wako)、10%ジエタノールアミン (Wako) を含むPBS溶液) を50  $\mu$ L/well入れ、遮光し、室温 $\sim$ 37 $^{\circ}$ Cで、5 $\sim$ 10分発色させた。マルチプレートオートリーダーNJ-2001 (Inter Med) で405nmの吸光度を測定した結果、評価したクローン全てが、I L - 6 に特異的であることが確認できた (図1)。

#### 【0032】

### 《実施例 4 : クローンの配列分析》

単離したクローンの s c F v 遺伝子の V H 及び V L の D N A 塩基配列をDye terminator cycle sequencing FS Ready Reaction kit (Applied Biosystems) を用いて決定した。ELISA及び配列分析の結果、単離したクローンは4種に分類された。

#### 【0033】

### 《実施例 5 : s c F v の発現と回収》

可溶性 s c F v を大腸菌HB2151を用いて発現させ、大腸菌ペリプラズム画分より回収、粗精製した。更に精製が必要な場合はRAPAS Purification Module (Pharmacia Biotech) 用いて、アフィニティ精製を行った。精製した s c F v 蛋白の純度は、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動と、s c F v 蛋白のC末端のEt

agエピトープを標的にしたウェスタンブロッティングにより確認した。s c F v 蛋白精製品の蛋白濃度の決定には、Protein Assay キット (BIO-RAD) を用いた。

#### 【0034】

##### 《実施例6：SPR法による精製 s c F v の親和性測定》

BIAcore (BIAcore社) を用いて、SPR法により精製 s c F v の親和性を測定した結果、最も高い親和性を示したクローンIL6gk3-2は、ヒト I L - 6 に対して  $13 \times 10^{-9} \text{M}$  の解離定数を有すると評価された (図2)。

#### 【0035】

##### 《実施例7：I L - 6 依存性細胞株の増殖応答に対する影響》

精製 s c F v を用いて、I L - 6 に依存的に増殖する細胞株 K T - 3 の I L - 6 依存的な増殖応答に対する阻害効果について検討した。 $2 \times 10^4$  個/200  $\mu$  l / ウェルに調製した K T - 3 を I L - 6 (80pg/ml) と 1.25~20  $\mu$  g/ml のクローンIL6gk3-2由来の精製 s c F v 存在下、4日間培養しチミジン取り込みによるDNA合成を評価した結果、クローンIL6gk3-2由来 s c F v は K T - 3 細胞の増殖応答を濃度依存的に抑制することが分かった (図3)

#### 【0036】

##### 【発明の効果】

本発明により、ヒト I L - 6 そのものと動物に免疫して得られた抗体と同程度以上の強さの親和力で結合し、その生物活性の一つである白血病細胞の I L - 6 依存的な増殖を抑制する抗体が得られた。この抗体は完全にヒト由来の配列であり、キメラ抗体やヒト型化抗体に比べて、低濃度で効果を有しかつ抗イディオタイプ抗体誘導能が極めて少ない抗 I L - 6 アンタゴニストとして、I L - 6 依存性の白血病や慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療薬として応用することが期待される。また副作用が少なく活性が強い、急性の炎症の治療薬としての利用も期待できる。



【0037】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

&lt;120&gt; Human antagonist against human interleukin-6

&lt;130&gt; JP

&lt;160&gt; 8

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 351

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 1

CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTC AAG CCC GGA GGG 48

Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

5

10

15

TCC CTA AGA CTC TCA TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGA AAG TAT 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr

20

25

30

TAC ATG GCC TGG ATC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CCG GAG TGG CTT 144

Tyr Met Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Leu

35

40

45

TCA ACC ATT AGT AAC AGC GGT GAT ATC ATA GAC TAT GCA GAC TCT GTG 192

Ser Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

AGG GGC CGG TTC TCC ATC TCC AGG GAC AAT GCC CAG AAG TCA CTG TAT 240

Arg Gly Arg Phe Ser Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Lys Ser Leu Tyr

65

70

75

80

CTG CAA ATG ACC TCC CTG AGA CCC GAC GAC TCG GCC ATC TAT TAC TGT	288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Pro Asp Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCG AGG GAA TAT TTC TTT TCT TTT GAT GTG TGG GGC CGA GGG ACA ATG	336
Ala Arg Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Met	
100 105 110	
GTC ACC GTC TCC TCA	351
Val Thr Val Ser Ser	
115	
<210> 2	
<211> 324	
<212> DNA	
<213> Human	
<400> 2	
GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCT GTG TCT GCA TCG GTG GGA	48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
5 10 15	
GAC AGA GTC ACC ATC TTT TGT CGG GCG AGT CAG GAT ATT AGG AAT TGG	96
Asp Arg Val Thr Ile Phe Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp	
20 25 30	
GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GGT GAG GCC CCT AAA TTA TTG ATC	144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
TAT GAT GGA TCG AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC	192
Tyr Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
AGT GGA TCT GGG ACA GAA TTC ACT CTC ACA ATC AGC AGC CTG CAG CCT	240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	

GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGT CAA CAG AGT GAC AGT ACC CCT ATT 288  
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile

85

90

95

ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAG ATT AAA CGT 324  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR1 of SEQUENCE No.1

&lt;400&gt; 3

Lys Tyr Tyr Met Ala

31

35

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CDR2 of SEQUENCE No.1

&lt;400&gt; 4

Thr Ile Ser Asn Ser Gly Asp Ile Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly

50

55

60

65

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;220&gt;

<223> CDR3 of SEQUENCE No.1

<400> 5

Glu Tyr Phe Phe Ser Phe Asp Val

100

105

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> CDR1 of SEQUENCE No.2

<400> 6

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Trp Val Ala

25

30

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> CDR2 of SEQUENCE No.2

<400> 7

Asp Gly Ser Ser Leu Gln Ser

50

55

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Human

<220>

<223> CDR3 of SEQUENCE No.2

<400> 8

Gln Gln Ser Asp Ser Thr Pro Ile Thr Phe

90

95

**【図面の簡単な説明】**

【図1】 IL-6gk シリス\*由来の IL6gk3-2scFvの組換え I L - 6、ヒト血清アルブミン (H S A)、AB型血清、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、macrophage inflammatory protein 1a(MIP-1a)との反応性をELISAで測定した図。

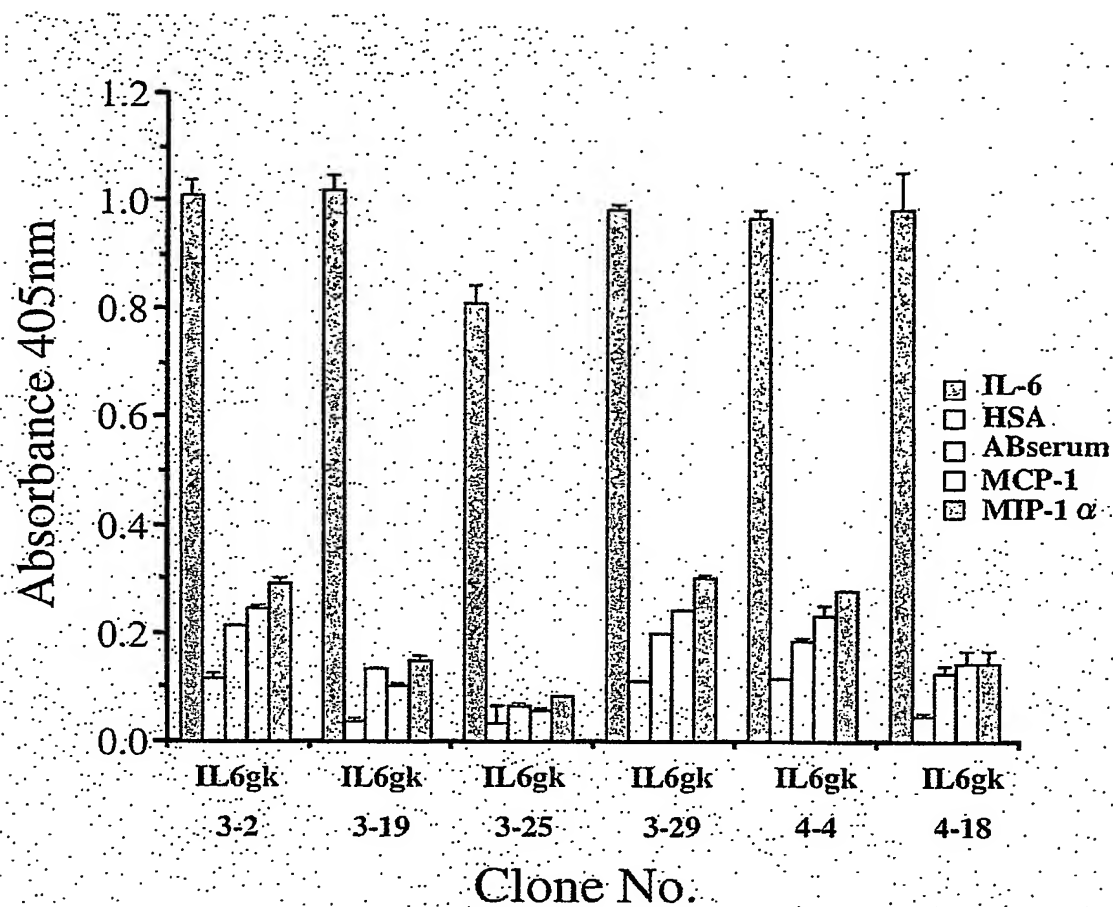
【図2】 BIA COREにより測定したIL6gk3-2scFvのIL-6との結合親和力を測定した結果を示す図。

【図3】 I L - 6 依存性細胞株KT-3の I L - 6 依存性の増殖応答をIL6gk3-2scFvが抑制した結果を示す図。

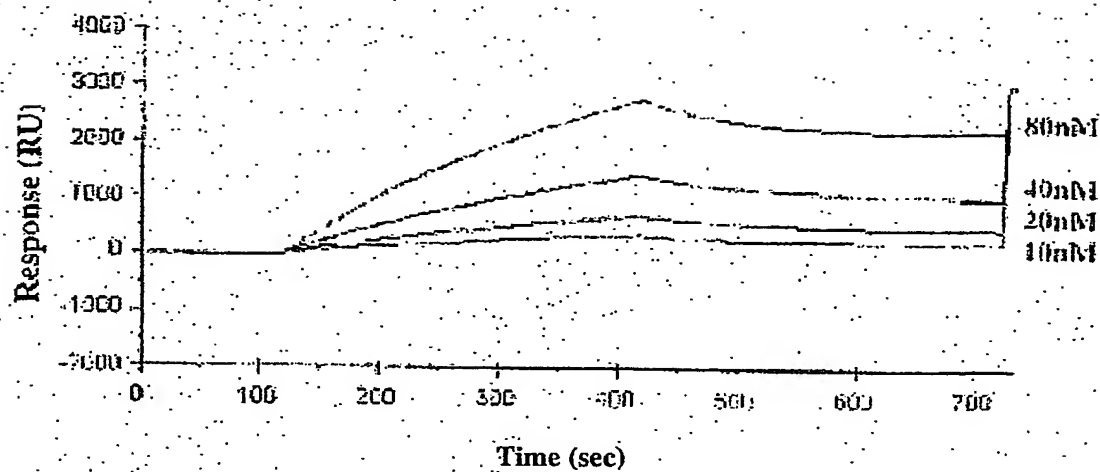
【書類名】

図面

【図 1】



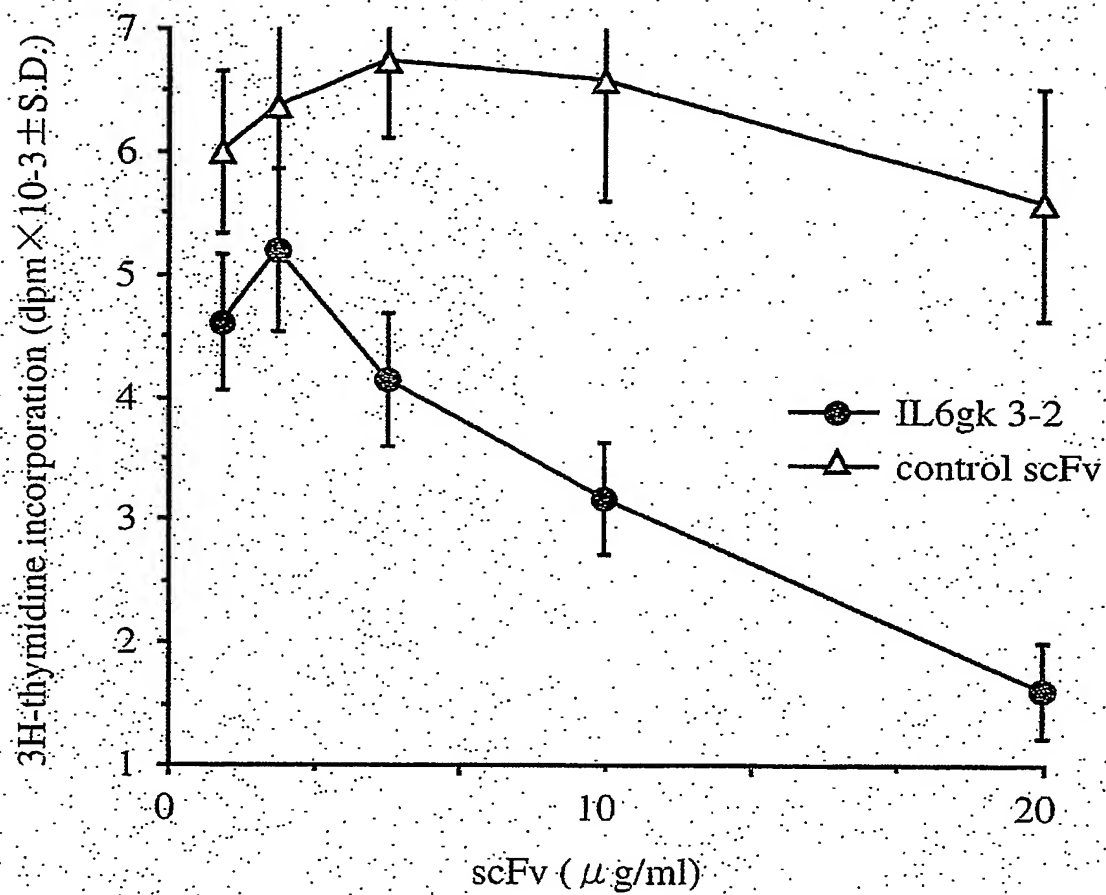
【図 2】



Immobilized protein	Ligand	$k_{\text{ass}}/10^5$ ( $\text{sec}^{-1}\text{M}^{-1}$ )	$k_{\text{diss}}/10^{-3}$ ( $\text{sec}^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
human IL-6	IL6gk3-2	$0.6 \pm 0.34$	$0.8 \pm 0.34$	13



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インターロイキン-6 (IL-6) が関与する免疫異常性疾患の治療に有効な物質の提供。

【解決手段】 ファージ抗体法を用いて、ヒト IL-6 に対して高い親和性を有するヒト抗ヒト IL-6 抗体及びヒト抗ヒト IL-6 抗体フラグメントを得た。当該抗体及び抗体フラグメントは、IL-6 が原因となって惹起される炎症、免疫異常性疾患の治療薬として期待される。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-253036
受付番号	50201295298
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 9月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 8月30日

次頁無

特願2002-253036

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所